第29卷 第1期 材 料 研 究 学 报 Vol. 29 No. 1
2015 年 1 月 CHINESE JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH January 2015

纳米纤维素/阳离子聚合物复合三维组织工程支架的性能*

唐爱民 刘 远 赵 姗

(华南理工大学 制浆造纸工程国家重点实验室 广州 510640)

摘 要 将纳米纤维素分别与高阳离子度的丙烯酸类、乙烯胺类聚合物复合, 制备出三维多孔组织工程支架并通过SEM观察了支架的形貌结构, 研究了高阳离子度的丙烯酸类、乙烯胺类聚合物的相对分子质量和用量对支架孔隙结构的影响; 用图像处理软件对采集的支架截面SEM图进行处理, 通过统计计算获得支架孔隙率数据, 建立了一种基于SEM图像快速测定支架孔隙率的新方法; 最后测定了支架的保水值。结果表明: 本文制备的纳米纤维素三维组织工程支架的孔隙率均大于90%。用图像处理得到的孔隙率与用液体置换法测得的孔隙率数值接近, 误差低于5%, 表明用图像处理方法测定的孔隙率可靠。纳米纤维素三维组织工程支架有很高的保水值(>200%), 调整阳离子聚合物的种类和用量可调控其孔隙率和保水值, 得到适合组织细胞培养的纳米纤维素三维组织工程支架。

关键词 复合材料, 纳米纤维素, 组织工程支架, 图像处理

分类号 TB332 文章编号 1005-3093(2015)01-0001-09

Performance of 3D Tissue Engineering Scaffolds of Nanocellulose/High Cationic Polymers Composite

TANG Aimin** LIU Yuan ZHAO Shan

(State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

*Supported by National Basic Research Program of China No. 2010CB732206.

Manuscript received June 18, 2014; in revised form September 15, 2014.

**To whom correspondence should be addressed, Tel: (020)87111225, E-mail: amtang@scut.edu.cn

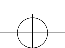
ABSTRACT Three-dimensional (3D) tissue engineering scaffolds were prepared by compounding nanocellulose with polyacrylic cationic polymer and polyethylene amine cationic polymer respectively. The structural morphology of the scaffolds was characterized by scanning electron microscopy (SEM). The influence of the relative molecular mass and dosages of the polymers on the pore structure of the scaffolds was investigated, while a new method for fast measuring the porosity of the scaffolds was established based on SEM image processing. The water retention value (WRV) of the scaffolds was also measured. Results show that the porosity of all the nanocellulose 3D tissue engineering scaffolds is larger than 90%. The porosity value obtained by the new image processing method is close to that measured according to Archimedes principle with a difference less than 5%, which indicated that this method was reliable. All the 3D scaffolds have high WRV (>200%). Both the porosity and WRV of the 3D scaffolds can be adjusted by varying the species and dosage of polymers. Therewith the nanocellulose 3D tissue engineering scaffolds may optionally be prepared to meet the requirement for tissue and cell culture.

KEY WORDS composites, nanocellulose, tissue engineering scaffold, image processing

"组织工程"(Tissue engineering)[1]是21世纪生命科学的前沿学科, 应用生命科学和工程学的基本原理能开发恢复、维持或改善受损组织或器官功能的生物替代物[2], 在骨、软骨、神经、血管、皮肤以及肠胃和泌尿生殖系统的组织中已有临床应用[3-8]。目前, 组织工程已经发展到使用三维支架培养细胞并将其移植到体内, 形成新的组织[9], 支撑细胞的繁殖, 迁移, 生长和分化, 并引导所需要组织的形成[10]。

来源于植物生物质的纳米纤维素是一种直径小于100 nm、长度几十到几百纳米的棒状纤维, 具有非常好的生物相容性。纳米纤维素在表面形态、官

* 国家重点基础研究发展计划2010CB732206资助项目。
2014年6月18日收到初稿; 2014年9月15日收到修改稿。
本文联系人: 唐爱民



能基团的作用力等方面具有独特的性能[11-13], 以其为基材制备的组织工程支架有较高的内表面积和体积比, 可为细胞的良好分布提供空间支持。纳米纤维素的直径与细胞外基质中胶原纤维的尺度为同一数量级, 可用于仿生构建细胞外基质的骨架, 在生物医学领域中有很好的应用前景[14, 15]。

多孔的形貌结构、孔隙率和保水值, 是评价用于"组织工程"培养细胞的三维支架好坏的重要指标[16]。在组织工程支架的发展历程中, 孔的结构是一项重要的影响因素。孔必须是联通的, 以满足细胞的生长和营养成分的输送[17]。合适的表面孔隙率可增强支架和周围宿主组织的机械连接, 在关键界面处提供必要的机械稳定性[18]。因此, 快速准确的测定孔隙率意义重大。目前测定孔隙率的方法, 主要有液体置换法[19]、压汞法[20]、电镜图像方法[21]等。液体置换法测定孔隙率需要测量物体的密度, 步骤繁琐且误差较大; 压汞法是在高压环境下测量, 对物体有一定的压缩性, 导致试样结构材料破损, 产生一定的误差。因此, 建立快速简便测量孔隙率的方法极为重要。唐朝生等[22]使用SEM照片计算了土颗粒的表观孔隙率, 并研究了不同阈值和分析区域大小等因素对孔隙率的影响。周明等[23]基于数字图像处理分析技术提出一种纳米纤维膜孔隙率的表征方法, 计算出的纳米纤维膜的孔隙率数据与密度法的测试相近。保水性也是组织工程支架的一项重要参数, 因为在支架中发生生理液的吸收、营养成分和代谢物的传送等生理现象[24]。Depan等[24]研究了骨组织工程支架的保水性能, 发现组织工程支架可保留比其自身重量还多的水分, 有利于在生物医学上的应用。Seniz Ucar等[25]研究了用湿法纺织制备的壳聚糖支架在生物传送体系中的保水性能, 发现这种组织工程支架有能力保留与其自重相当的水分。这种保水能力, 对于维持本身粘弹性能是非常重要的。

本文以纳米纤维素为原料, 分别添加高阳离子度的丙烯酸类、乙烯胺类聚合物, 采用冷冻干燥方法制备纳米纤维素三维组织工程支架。用扫描电镜(SEM)观察其形貌结构, 研究聚合物的相对分子质量和用量对支架孔隙结构的影响; 为了建立快速测定支架孔隙率的方法, 用Matlab[26]软件图像处理技术和统计计算功能测定支架的孔隙率, 并与液体置换法的测定结果比较。从聚合物的相对分子质量和用量、支架成型条件控制等方面调控支架的孔隙率和保水值, 以期制备出高孔隙率、高保水值和一定机械强度、适合组织细胞培养的纳米纤维素三维组织工程支架。

1 实验方法

1.1 主要原料

漂白桉木浆: 打浆度为25° SR, α-纤维素含量为86.8%, 聚丙烯酸类阳离子聚合物、相对分子量为600万(标记为聚合物A), 聚乙烯胺类阳离子聚合物、相对分子量为300万(标记为聚合物B), 两种聚合物的阳离子度均为10。

1.2 样品的制备

使用中性TEMPO-媒介氧化体系氧化漂白按木浆制备氧化纤维素[27]。将氧化纤维素分散在去离子水中配成质量分数为0.5%的悬浮液, 用Nano DeBEE型高压均质机进行高压均质。先使用D8喷嘴在30 Kpsi条件下均质4次, 再使用D5喷嘴在40 Kpsi条件下均质8次, 得到纳米纤维素水分散液, 在4℃保存。

将聚合物A和聚合物B分别溶于去离子水中配成浓度为0.05%(质量分数)的溶液, 将其按照不同的体积比与0.5%浓度 的纳米纤维素混合, 用超声波粉碎机超声80 s让液体分散均匀, 滴入聚四氟乙烯模版中(孔直径15 mm, 孔深7 mm), 先在−20℃的条件下预冻12 h, 再放入冷冻干燥机中冷冻15 h, 冷冻温度−50℃, 冷干后得到三维多孔组织工程支架, 放于密封袋中保存。

1.3 测试与表征

将纳米纤维素水分散液滴于云母片上, 真空干燥4 h, 干燥后用Veeco Di Multimode SPM多模式扫描探针显微镜在敲击模式下观察其表面。

将制备出的支架置于聚四氟乙烯模板中(孔直径15 mm, 孔深4 mm), 用锋利的刀片在室温条件下将其切片。用导电胶将表面光滑的切片粘贴在小金属片上, 喷金后在HITACHI S－4300扫描电镜(SEM)下观察其形貌。

用液体置换法[19]测定支架的孔隙率。在恒温30℃将无水乙醇装满比重瓶, 称其质量为 W_1; 再将质量为 W_s 的样品加入比重瓶中, 循环抽真空直至乙醇充满样品的孔隙。将比重瓶用无水乙醇加满, 称其质量为 W_2; 取出充满无水乙醇的样品, 剩余的无水乙醇与比重瓶质量为 W_3。每个配比的支架平行测4个样, 取平均值。支架的孔隙率为

$$\varepsilon = (W_2 - W_3 - W_s)/(W_1 - W_3)$$

使用Matlab软件中图像处理功能, 先对支架的SEM像选择合适的阈值, 将SEM像转换成二值黑白照片。其中白色部分代表孔壁, 黑色部分代表孔隙,

得到与原结构最相近的结构图片, 然后依据Matlab软件中数学运算功能根据黑白二值照片不同颜色区域的面积数值进行统计计算, 得到支架的孔隙率数值。

参照纤维的保水值(WRV)测定方法[28]测定支架的保水值。将一定质量的样品装在200目的滤网中, 在20℃吸水10 min后将滤网放在离心管中夹紧, 用离心机在20℃、4500 r/min条件下离心10 min, 取出后称样品湿重 W_1, 将样品在烘箱中烘4 h后其绝干重为 W_2。每个配比的样品平行测4个样, 取平均值。则支架的保水值为

$$\mathrm{WRV}(\%)=(W_1-W_2)*100/W_2$$

2 结果和讨论

2.1 纳米纤维素的形貌

图1给出了纳米纤维素的AFM高度图。从图1可见, 纳米纤维素呈现短棒状的结构特征, 并有椭球形颗粒; 纤维的长径比约为10左右, 大部分纤维长度约为100 nm, 有少量200 nm长度的纤维, 而纤维的宽度均小于10 nm。由于巨大的比表面积效应, 纳米纤维素易于絮聚交织在一起形成致密的结构。

2.2 聚合物用量对组织工程支架形貌的影响

为了研究聚合物用量对支架形貌结构的影响, 在支架中添加了两种不同类型的阳离子聚合物, 其主链结构和相对分子质量不同。一种是主链为聚丙烯酸类的阳离子聚合物A, 其相对分子质量为600万; 另一种是主链结构为聚乙烯胺类的阳离子聚合物B, 其相对分子质量为300万。两种聚合物均带有氨基类的阳离子基团。图2给出了添加不同用量的阳离子聚合物A的支架的SEM像, 其中图2a是未添

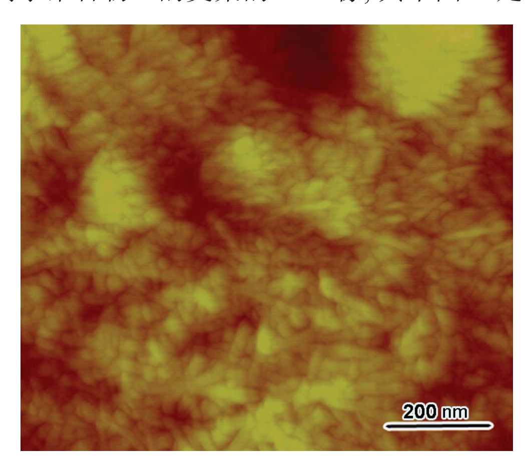


图1 纳米纤维素的AFM像
Fig.1 AFM image of nanocellulose

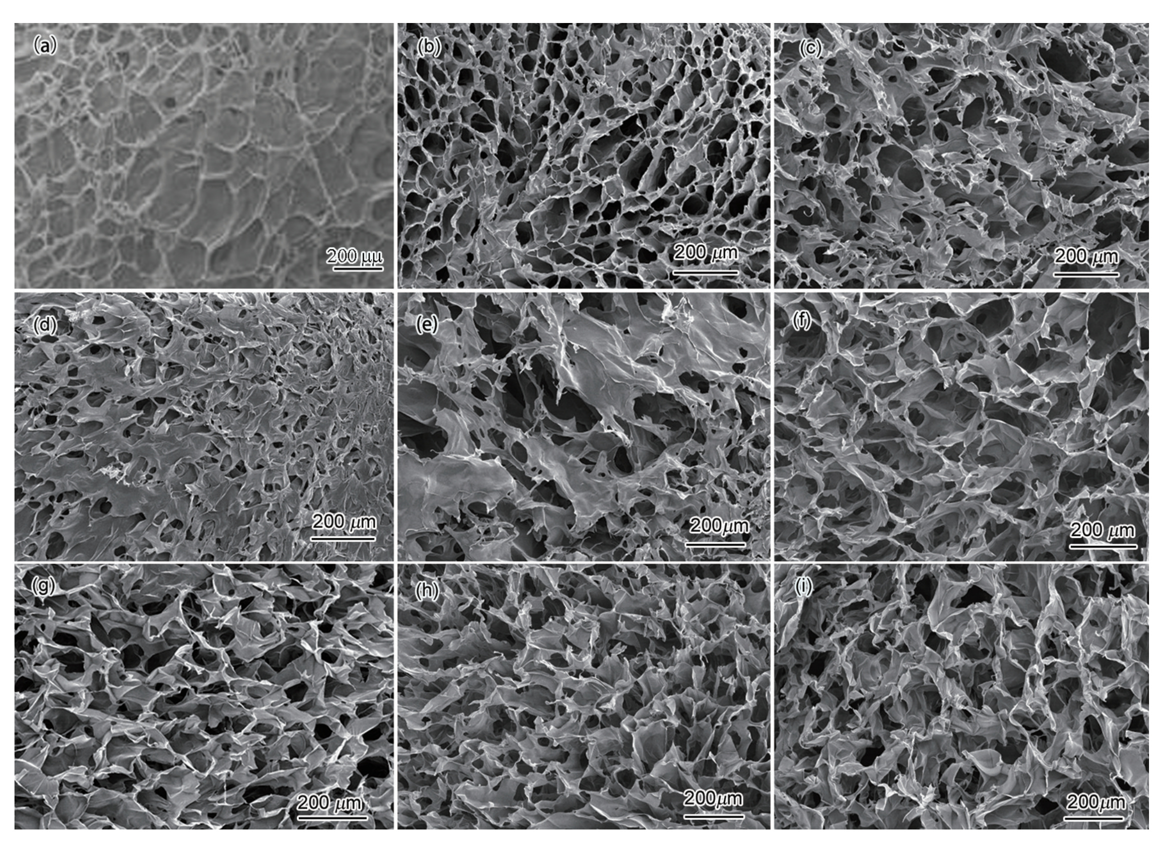
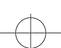


图2 纳米纤维素与聚合物A复合支架的SEM像
Fig.2 SEM images of scaffolds prepared by compounding nanocellulose with different percentage of polymer A. (a) 0; (b, f) 0.79%; (c, g) 1.57%; (d, h) 3.85%; (e, i) 7.41% (a-e, surface section; f-i, cross section)



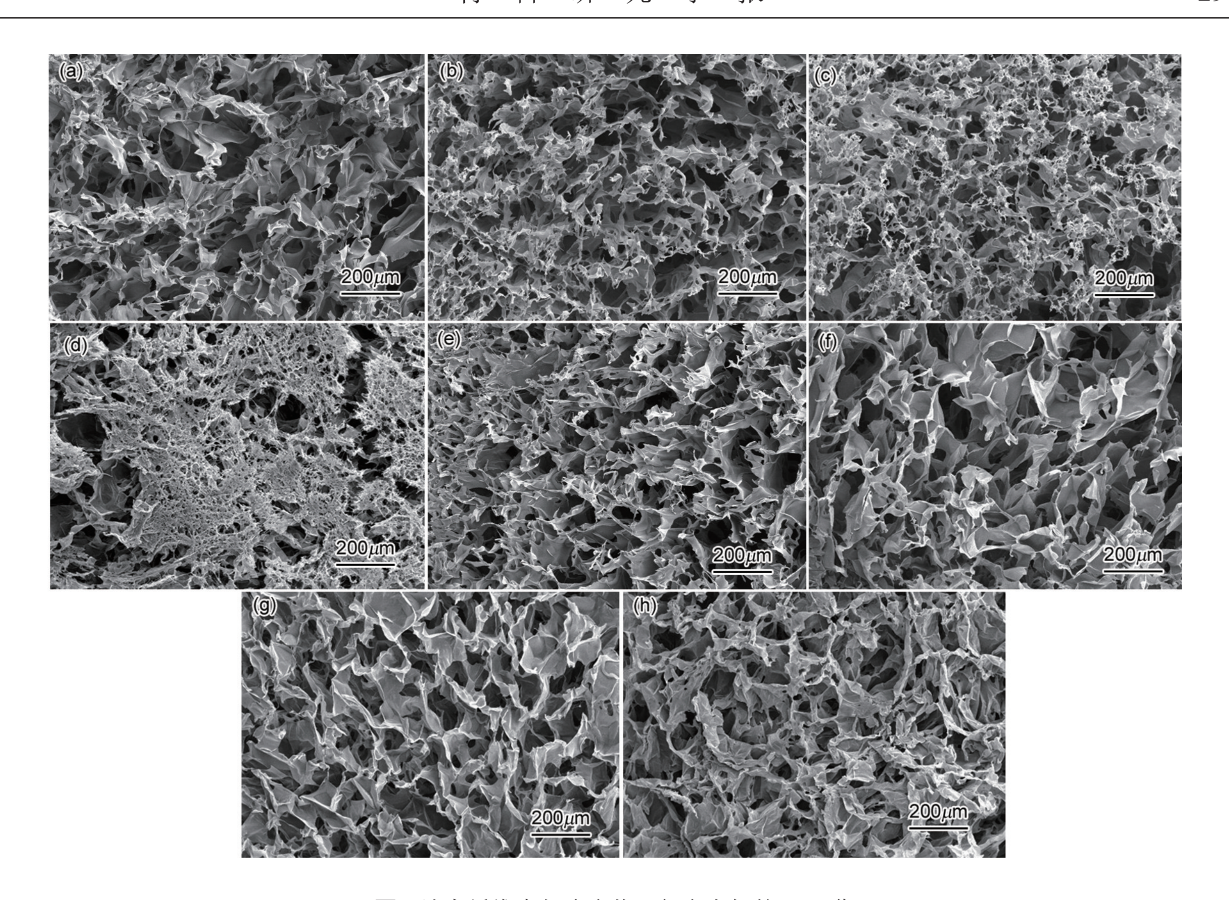


图3 纳米纤维素与聚合物B复合支架的SEM像

Fig.3 SEM images of scaffolds prepared by compounding nanocellulose with different percentage of polymer B. (a, e) 0.79%; (b, f) 1.57%; (c, g) 3.85%; (d, h) 7.41% (a-d, surface section; e-h, cross section)

加阳离子聚合物的纯纳米纤维素支架的SEM像。图3是添加不同量的聚合物B的支架的SEM像。图2a表明, 用纯纳米纤维素制备的支架表面形成了闭孔结构, 孔的连通性差, 不利于生理营养物质的传输以及代谢物的排出, 对细胞的生长发育不利。因此, 这种纯纳米纤维素支架不符合组织工程的要求。

从图2的表面形貌图可见, 添加聚合物A制备的纳米纤维素支架形成了多孔的网络结构, 既有直径尺寸为40-300 μm的大孔, 也有十几微米的微孔, 其孔形貌和数量与聚合物A的用量有关。随着聚合物A用量的增加支架表面的孔数目减少, 闭孔现象增多, 并且孔隙致密性提高。在聚合物A的质量分数为0.79%时, 支架表面的孔隙最规整有序, 且闭孔现象少。

由图2的截面图可见, 支架中纳米纤维素与聚合物复合形成了孔相互贯通的多孔结构, 并可观察到由纤维形成的网络结构, 对细胞的生长非常有利。随着聚合物A用量的增加, 支架内部的微孔数目减少, 孔排列的规整性变差。

由图3的支架表面形貌可见, 与添加聚合物A相同, 添加聚合物B制备的纳米纤维素支架也具有多孔的网络结构。但是孔的尺寸较小, 其中较大孔的孔径为50-200 μm, 微孔孔径尺寸为几个微米。与聚合物A相同, 添加聚合物B的纳米纤维素支架在表面也出现了不同程度的闭孔现象, 其中当聚合物B的质量分数为7.41%时闭孔现象最严重。

图3中的截面图表明, 添加聚合物B的纳米纤维素支架形成了上下联通的通道, 孔的连通性较好; 同时, 支架的形貌结构随聚合物B的质量分数不同而有较大的差异。在聚合物B的质量分数为0.79%和7.41%时微孔数目较多, 并且闭孔现象较严重; 在聚合物B的质量分数为1.57%和3.85%时闭孔现象相对较少, 大孔数目较多, 孔径分布均匀性较好, 且支架多孔疏松、孔内部连通性较好。支架结构中形成的上下联通的多孔结构, 对细胞的吸附和生长以及营养成分的输送都是有利的。

2.3 支架孔隙率的测定

2.3.1 液体置换法测定支架的孔隙率 先采用液体置换法测定了支架的孔隙率。图4给出了添加阳离子高聚物A和B复合制备的支架孔隙率与聚合物用量的关系。从图4可见, 随着聚合物A质量分数的增加, 由聚合物A与纳米纤维素复合制备的支

架孔隙率总体呈现降低的趋势, 当聚合物A的质量分数由0.79%增加到7.41%时, 支架的孔隙率由97.42%下降至93.70%。在质量分数为7.41%时孔隙率最小。添加聚合物B的纳米纤维素支架的孔隙率随聚合物用量的变化, 与添加聚合物A的情况有所不同。当聚合物B的质量分数由0.79%增加到1.57%时, 支架孔隙率由93.96%增加到96.76%, 进一步提高聚合物B的用量, 支架的孔隙率反而下降, 当聚合物B的质量分数由1.57%提高到7.41%时, 孔隙率由96.76%降低到90.77%。

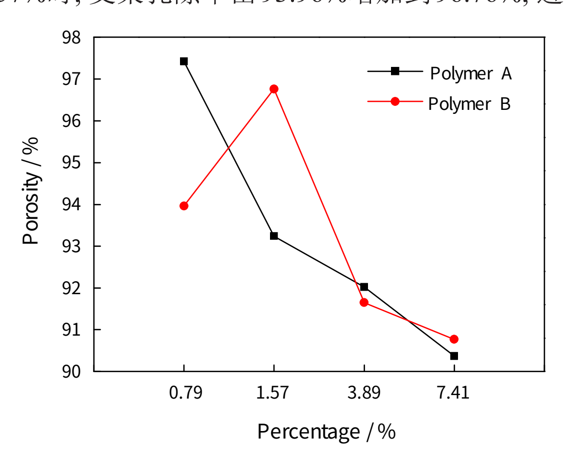


图4　液体置换法测定的纳米纤维素分别与聚合物A、B复合支架的孔隙率

Fig.4 Porosity measured by liquid displacement experiment for nanocellulose/polymer A and nanocellulose/polymer B compound scaffolds

比较图4中两种阳离子聚合物复合制备的支架的孔隙率, 当聚合物质量分数为7.41%时, 孔隙率均达到最小值。其原因可能是, 阳离子聚合物质量分数越高, 与纤维间的结合点就越多, 制备出的纳米纤维素复合支架的结构更致密, 因此孔隙率降低。图4中两种聚合物分别与纳米纤维素复合制备出的支架, 不管以哪种比例复合其相对应的支架的孔隙率都超过了90%。聚合物支架的孔隙率应以大于80%为宜[29], 添加两种聚合物制备的支架都具有较高的的孔隙率, 符合组织细胞生长与繁殖的要求。

2.3.2 基于SEM图像处理技术测定支架的孔隙率　先使用Matlab软件将支架的SEM图像转换成黑白二值照片, 所选用的SEM图片为图1和图2中的截面图, 处理后的结果如图5所示。然后根据黑白二值照片的不同颜色区域的面积数值进行统计计算, 得到支架的孔隙率数值。统计计算时, 对图5的图像按照黑白颜色划分为孔和孔壁, 图6是孔壁和孔的区分示意图。图6中白色部分代表孔壁, 黑色区域代表孔隙, 依据两部分所占面积进行统计计算,

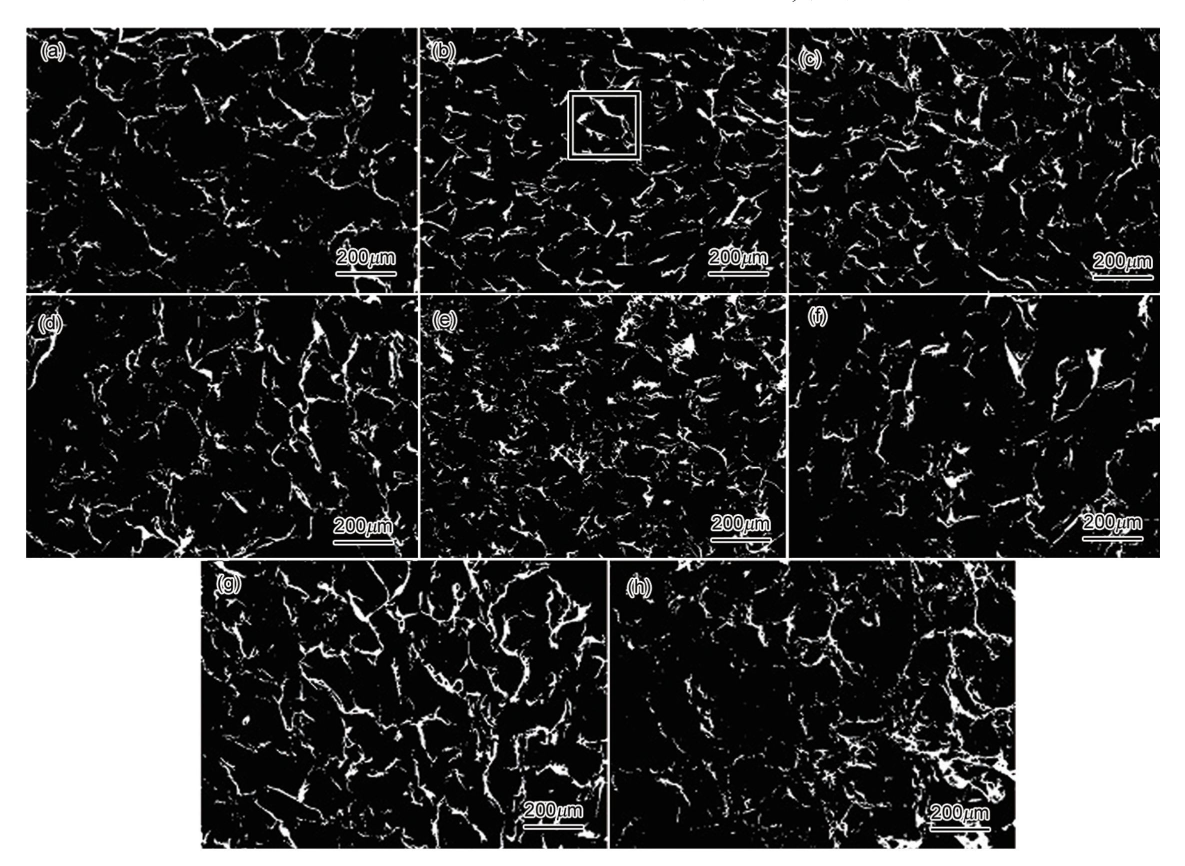
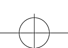


图5 阈值分割后所得复合支架A、B的SEM像

Fig.5 SEM images after threshold segmentation (mass percentage of polymers: (a, e) 0.79%, (b, f) 1.57%, (c, g) 3.85%, (d, h)7.41%; a-d, polymer A; e-h, polymer B)



得到孔隙率数值。统计结果如图7所示。图7表明,添加聚合物A的纳米纤维素多孔支架,其孔隙率随聚合物A质量分数的增加而下降,但总体下降幅度不大。当聚合物A的质量分数由0.79%增加至1.57%时,支架的孔隙率下降较为明显,由94.98%降低至93.43%;而后随着聚合物A质量分数的进一步增大,孔隙率变化不明显,在质量分数为7.41%时孔隙率数值为93.70%。而由聚合物B与纳米纤维素复合制备的支架,其孔隙率随聚合物用量的变化没有规律性。在聚合物质量分数为0.79%-7.41%的范围内,支架的孔隙率在90.67%-94.93%之间,在质量分数为1.57%时支架的孔隙率最大为94.93%。

2.3.3 液体置换法与图像处理法测定孔隙率的比较 为了探讨图像处理技术法测定孔隙率的可行性,分别针对两种聚合物A、B复合制备的支架,将液体置换法和图像处理技术法所测得的孔隙率数值进行对比分析,结果如图8、图9、表1和表2所示。由图8和表1可见,用两种测定方法得到的纳米纤维素/聚合物A复合支架的孔隙率有一定的偏差,但偏差不大,平均绝对误差为1.88%,平均相对误差为2.02%。当聚合物A质量分数为1.57%时两者误差最小,当聚合物A质量分数为7.41%时误差最大,绝对误差为3.33%,相对误差为3.68%,且图像处理法测试结果高于液体置换法测试结果。但是偏差都小于5%,表明用图像处理法表征纳米纤维素/阳离子聚合物A复合支架的孔隙率是比较准确的。

图9和表2中的数据表明,用两种测定方法测得的纳米纤维素/聚合物B复合支架的孔隙率也甚为相近,且孔隙率随聚合物B质量分数的变化有比较一致的规律。两种方法的最大绝对误差为1.83%,最大相对误差为1.89%,平均绝对误差为1.50%,平均相对误差为1.6%。与纳米纤维素/阳离子聚合物A复合支架的测试结果相比,用图像处理法对纳米

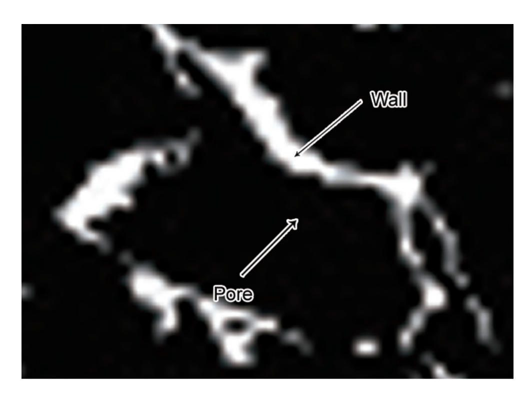


图6 阈值分割后图像的局部放大图

Fig.6 SEM image with partial enlargement after threshold segmentation

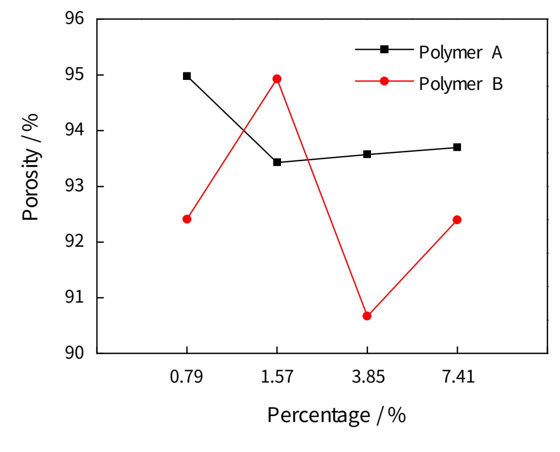


图7 图像处理法测定的纳米纤维素分别与阳离子聚合物A、B复合制备的支架的孔隙率

Fig.7 Porosity measured by image processing method for nanocellulose/polymer A and nanocellulose/polymer B compound scaffolds

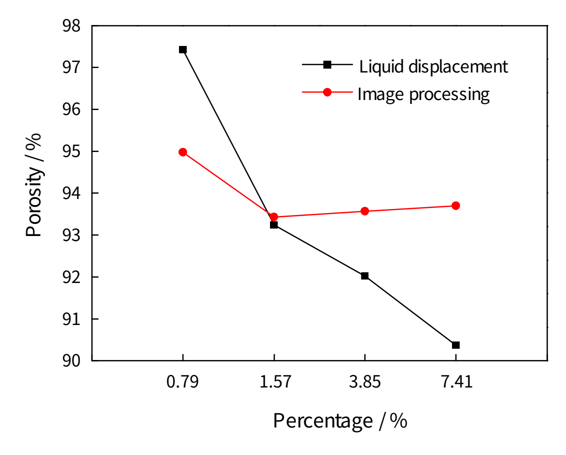


图8 图像处理法和液体置换法测定纳米纤维素/聚合物A复合支架的孔隙率比较

Fig.8 Comparison of the porosity measured by liquid displacement experiment and image processing method for nanocellulose/polymer A compound scaffolds

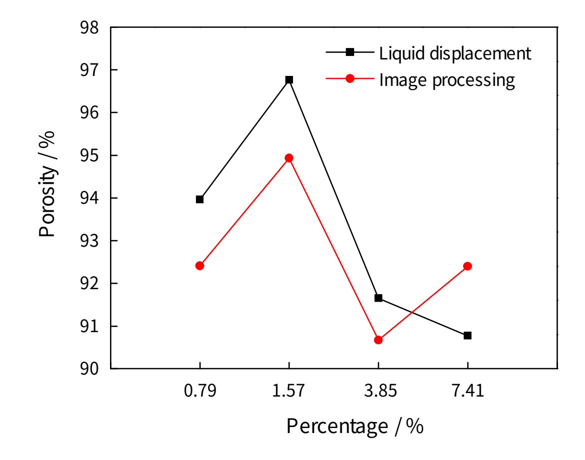


图9 图像处理法和液体置换法测定纳米纤维素/聚合物B复合支架的孔隙率比较

Fig.9 Comparison of the porosity measured by liquid displacement experiment and image processing method for nanocellulose/polymer B compound scaffolds

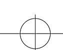


表 1 纳米纤维素/聚合物 A 复合支架孔隙率的图像处理法和液体置换法测试数据比较
Table 1 Porosity data of the nanocellulose/polymer A compound scaffolds measured by liquid displacement experiment and image processing method

Mass percentage of polymer A /%	Image processing /%	Liquid displacement /%	Absolute error/%	Relative error/%
0.79	94.98	97.42	2.44	2.5
1.57	93.43	93.24	0.19	0.2
3.85	93.57	92.02	1.55	1.68
7.41	93.70	90.37	3.33	3.68

表 2 纳米纤维素/聚合物 B 复合支架孔隙率的图像处理法和液体置换法测试数据比较
Table 2 Porosity data of the nanocellulose/polymer B compound scaffolds measured by liquid displacement experiment and image processing method

Mass percentage of polymer B/%	Image processing/%	Liquid displacement/%	Absolute error/%	Relative error/%
0.79	92.41	93.96	1.55	1.65
1.57	94.93	96.76	1.83	1.89
3.85	90.67	91.65	0.98	1.07
7.41	92.40	90.77	1.63	1.79

纤维素/阳离子聚合物 B 复合支架的孔隙率评价更为准确。

图像处理法与液体置换法的测试结果有一定的误差, 造成这些误差的原因可能是: (1)用图像处理法测孔隙率时, 获取的 SEM 像可能本身存在一定的误差。电镜扫描是对组织工程支架表面进行, 会产生折射、反射等, 导致图像部分失真; (2) 对 SEM 像处理时, 选取阈值时人为的主观因素产生误差[23]。尽管两种测试结果有一定的误差, 但是用两种方法测得的孔隙率数值甚为相近, 其绝对误差最大为 3.33%, 相对误差最大为 3.68%。特别是, 用图像处理技术法测定孔隙率更方便快捷。因此, 用图像处理技术法来快速测定支架孔隙率的方法是可行的。

2.4 支架的保水值

对添加两种聚合物制备的支架的保水值进行了测定, 结果见图 10。图 10 表明, 未添加高阳离子度聚合物的纯纳米纤维素支架的保水值为 1575%, 其制备出来的支架保水值达到最大值。随着聚合物 A 质量分数的增加, 支架的保水值降低, 当聚合物 A 的用量为 0.79%时, 支架的保水值为 654.10%, 当聚合物 A 的用量由 1.57%提高的到 7.41%时保水值由 649.12%下降至 349.1%。这与用液体置换法测定的孔隙率变化规律一致, 说明孔隙率越大支架的保水值也越大。

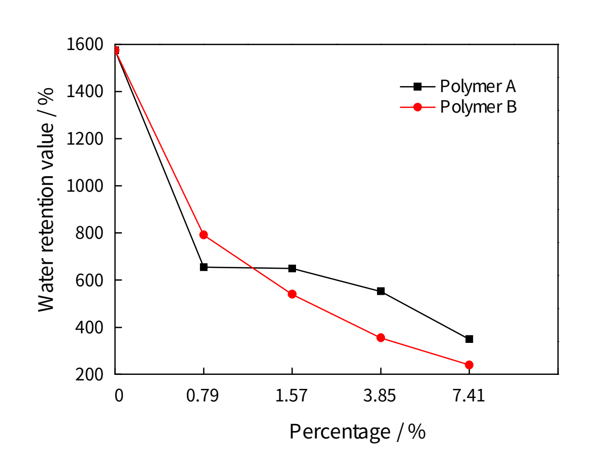


图 10　纳米纤维素与阳离子聚合物 A、B 复合支架的保水值
Fig.10 Water retention value of scaffolds made of different percentage of polymers A and B with nanocellulose

从图 10 可见, 添加聚合物 B 的支架其保水值随聚合物用量的增加也呈下降趋势。在质量分数由 0.79%增加至 7.41%时, 保水值由 790.78%下降至 239.44%。这与用两种方法测定的孔隙率的变化趋势不同, 说明支架的保水值不仅跟孔隙率有关, 还受到其它因素的影响。本文采用的两种聚合物的阳离子度均为 10, 其阳离子基团均是氨基类。聚合物 A 带有阴离子基团——羧基。聚合物 A 的大分子与带有羧基的纳米纤维素相互排斥, 导致支架的孔隙

率较高; 同时, 羧基对水可能有更强的吸附作用, 导致其保水值增大。聚合物A的相对分子质量更高, 使支架有更高的保水值。在本文实验条件下, 添加两种聚合物的纳米纤维素支架均有较高的保水值, 均超过200%, 有利于支架的吸水润胀和细胞的生长。

3 结　论

用聚丙烯酸类阳离子聚合物A和聚乙烯胺类阳离子聚合物B分别与纳米纤维素以不同比例混合, 采用冷冻干燥方法可制备三维多孔组织工程支架。用液体置换法和图像处理两种方法测定支架的孔隙率, 通过绝对误差和相对误差对图像处理法可靠性的评价结果表明, 用图像处理法测定孔隙率数值是可行的。添加两种聚合物制备的纳米纤维素复合支架的孔隙率均大于90%, 是高孔隙率材料, 且保水值均大于200%, 适合组织细胞的生长和繁殖。

参 考 文 献

1 ZHANG Anxiong, LV Delong, ZHONG Wei, CHENG Weizhuang, DU Qiangguo, Study advances in natural biomaterials for tissue engineering, Beijing Biomedical Engineering, **24**(5), 387(2005)
(张安兄, 吕德龙, 钟　伟, 程为庄, 杜强国, 天然生物材料构建组织工程支架的研究进展, 北京生物医学工程, **24**(5), 387(2005))

2 R. Langer, J. P. Vacanti, Tissue engineering, Science, **260**(5110), 920(1993)

3 J. M. Holzwarth, P. X. Ma, Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, **32**(36), 9622(2011)

4 Michael Keeney, Janice H. Lai, Fan Yang, Recent progress in cartilage tissue engineering, Current Opinion in Biotechnology, **22**(5), 734(2011)

5 D. Y. Lewitus, J. Landers, J. R. Branch, K. L. Smith, G. Callegari, J. Kohn, A. V. Neimark, Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering, Advanced Functional Materials, **21**(14), 2624 (2011)

6 S. He, T. Xia, H. Wang, L. Wei, X. Luo, X. Li, Multiple release of polyplexes of plasmids VEGF and bFGF from electrospun fibrous scaffolds towards regeneration of mature blood vessels, Acta Biomaterialia, **8**(7), 2659(2012)

7 S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann, A. S.Klar, L. Pontiggia, J. Rac, D. Nadal, M. Meuli, Tissue engineering of skin: human tonsil-derived mesenchymal cells can function as dermal fibroblasts, Pediatric Surgery International, **30**(2), 213(2014)

8 B. Andrée, A. Bär, A. Haverich, A. Hilfiker, Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering: review, Tissue Engineering Part B: Reviews, **19**(4), 279(2013)

9 T. Saito, M. Hirota, N. Tamura, S. Kimura, H. Fukuzumi, L. Heux, A. Isogai, Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions, Biomacromolecules, **10**(7), 1992(2009)

10 S. Iwamoto, A. N. Nakagaito, H. Yano, Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites, Applied Physics A, **89**(2), 461(2007)

11 T. Lu, Q. Li, W. Chen, H. Yu, Composite aerogels based on dialdehyde nanocellulose and collagen for potential applications as wound dressing and tissue engineering scaffold, Composites Science and Technology, **94**, 132(2014)

12 I. Siró, D. Plackett, Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review, Cellulose, **17**(3), 459(2010)

13 R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, J. Youngblood, Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites, Chemical Society Reviews, **40**(7), 3941(2011)

14 E. M. Fernandes, R. A. Pires, J. F. Mano, R. L. Reis, Bionanocomposites from lignocellulosic resources: Properties, applications and future trends for their use in the biomedical field, Progress in Polymer Science, **38**(10), 1415(2013)

15 Jiankang Song, Aimin Tang, Tingting Liu, Jufang Wang, Fast and continuous preparation of high polymerization degree cellulose nanofibrils and their three-dimensional macroporous scaffold fabrication, Nanoscale, **5**(6), 2482(2013)

16 F J O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today, **14**(3), 88(2011)

17 C. M. Murphy, M. G. Haugh, F. J. O'Brien, The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen－glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, **31**(3), 461(2010)

18 B. J. Story, W. R. Wagner, D. M. Gaisser, S. D. Cook, A. M. Rust-Dawicki, In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating, International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **13**(6), 749(1998)

19 G. Shi, Q. Cai, C. Wang, N. Lu, S. Wang, J. Bei, Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly (L－lactic acid) and poly (L－lactic－co－glycolic acid), Polymers for Advanced Technologies, **13**(3-4), 227(2002)

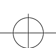
20 LIU Qi, HU Yafei, XIONG Jianjun, Experimental study on porosity measurement on graphite porous materials, Lubrication Engineering, **35**(10), 99(2010)
(刘　颀, 胡亚非, 熊建军, 石墨多孔材料孔隙率测定方法研究, 润滑与密封, **35**(10), 99(2010))

21 S. Maria, Methods for porosity measurement in lime-based mortars, Construction and Building Materials, **24**(12), 2572(2010)

22 TANG Chaosheng, SHI Bin, WANG Baojun, Factors affecting analysis of soil microstructure using SEM, Chinese Journal of Geotechnical Engineering, **30**(4), 560(2008)
(唐朝生, 施　斌, 王宝军, 基于SEM土体微观结构研究中的影响因素分析, 岩土工程学报, **30**(4), 560(2008))

23 ZHOU Ming, WANG Hongbo, WANG Yinli, GAO Weidong, Characterization of porosity of nanofiber membrane based on image processing technology, Journal of Textile Research, **33**(1), 20(2012)
(周　明, 王鸿博, 王银利, 高卫东, 基于图像处理技术的纳米纤维膜孔隙率表征, 纺织学报, **33**(1), 20(2012))

24 D. Depan, P. K. C. Venkata Surya, B. Girase, R. D. K. Misra, Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering, Acta biomaterialia, **7**(5), 2163(2011)



25 S. Ucar, P. Yilgor, V. Hasirci, N. Hasirci, Chitosan - based wet - spun scaffolds for bioactive agent delivery, Journal of Applied Polymer Science, **130**(5), 3759(2013)
26 S. Attaway, Matlab: A practical introduction to programming and problem solving, Elsevier, (2012)
27 SONG Jiankang, Preparation of cellulose nanofibrils and their application in tissue engineering scaffold, Master degree (South China University of Technology, 2012)
(宋建康, 纤维素纳米纤维的制备及其在组织工程支架中的应用, 硕士论文(华南理工大学, 2012))
28 X. Luo, J. Y. Zhu, Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses, Enzyme and Microbial Technology, **48**(1), 92(2011)
29 HUANG Jinzhong, LI Xuesheng, LU Zejian, QUAN Daping, In vitro and in vivo study on the degradation and biocompatibility of a poly- DL- lactide(PLE) polymer, modem Rehabilitation, **5**(7), 58 (2001)
(黄金中, 李雪盛, 卢择俭, 全大萍, 新型高孔隙率海绵状聚乳酸支架在软骨组织工程研究和应用中的意义, 现代康复, **5**(7), 58 (2001))

